云 南 植 物 研 究 2007，29 (3)：345～350
Acta Botanica Yunnanica

乌天麻 Gastrodianin 基因的鉴定及其在天麻发育进程中的表达*

王浩鑫[1,2]，杨 涛[1,2]，曾 英[1**]，胡 忠[1]
(1 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204；2 中国科学院研究生院，北京 100039)

摘要：基于相似性克隆策略和 RT-PCR，从兰科植物乌天麻（*Gastrodia elata* f. *glauca*）球茎克隆得到两个新的天麻抗真菌蛋白基因，命名为 *gastrodianin*-4*A*（*ga*4*A*）和 *gastrodianin*-4*B*（*ga*4*B*），并首次用 Northern 杂交研究了该基因在植物不同部位的转录表达。结果表明，天麻个体的不同部位只转录表达同一种 Gastrodianin 基因，纯化自球茎的 Gastrodianin 蛋白质的肽质量指纹谱与推导的 Ga4A 和 Ga4B 成熟蛋白的氨基酸序列相吻合；Northern 杂交证明天麻的地上器官 Gastrodianin 基因转录表达量远远高于地下球茎，而次生球茎皮层组织的表达量比中柱和整个营繁茎的都高一些。天麻球茎 Gastrodianin 的外周表达模式可能是天麻在地下抵御蜜环菌（*Armillaria mellea* Karst）入侵球茎皮层内部的防卫机制之一，但该基因在天麻地上部分的高丰度表达暗示 Gastrodianin 可能蕴藏其它生理功能。

关键词：天麻抗真菌蛋白；表达；乌天麻；兰科；蜜环菌
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2007) 03-345-06

Identification of the Gastrodianin Gene *ga*4*B* in an Achlorophyllous Plant *Gastrodia elata* (Orchidaceae) and Its Expression Pattern during Life Cycle*

WANG Hao-Xin[1,2]，YANG Tao[1,2]，ZENG Ying[1**]，HU Zhong[1]
(1 *Kunming Institute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China；
2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100039，China)

Abstract: Through a similarity-based cloning strategy，two types of cDNA clones with complete cDNA sequences matching the known gastrodianins were obtained from *Gastrodia elata* f. *glauca*（Orchidaceae）and designated *gastrodianin*-4*A*（*ga*4*A*）and *gastrodianin*-4*B*（*ga*4*B*），respectively. But only one identical isoform was found to be expressed in all different parts of a single plant. The deduced amino acid sequences of *ga*4*A*-4*B* accord closely with those of the plant-purified gastrodianins based on the peptide mass fingerprinting analysis. RNA gel blot analyses indicate that gastrodianins were much more abundantly expressed in the fully-opened flowers than the underground corms where an enhanced expression was found in the out layers of secondary corms. From its expression pattern and level in corms，the gastrodianin is assumed to prevent *Armillaria* hyphae from growing on secondary corms and retard the further penetration of *Armillaria* hyphae into nutritive corms. Gastrodianins are therefore considered to play a defensive role against the fungus *Armillaria*. Given the apparently abundant expression in the above-ground parts of the plant，however，gastrodianins seem unlikely to be limited to such a role.

Key words: Gastrodianin；Expression pattern；*Gastrodia elata*；Orchidaceae；*Armillaria mellea*

---

* 基金项目：云南省自然科学基金项目（2003C0059M）资助
** 通讯联系人 Author for correspondence；E-mail：biochem@mai.kib.ac.cn
收稿日期：2006-10-17，2006-12-18 接受发表
作者简介：王浩鑫（1979-）男，博士生，主要从事天然产物的生物合成研究。E-mail：whaoxing@mail.kib.ac.cn

天麻（*Gastrodia elata* Bl.）是一种传统的中药材，在中国已有上千年的使用历史。它是不含叶绿素的异养型兰科植物，依赖蜜环菌（*Armillaria mellea* Karst）完成其生活史。天麻生长在地下，只是开花期间花葶花序伸出地面高达 1 m。蜜环菌菌丝定植于营养繁殖茎（简称营繁茎）或初生球茎，但并不侵染从营繁茎上长出的次生球茎。营繁茎表面覆盖大量的棕褐色菌索，而菌丝进入营繁茎的表皮层并在此被消化成为供次生球茎生长的营养物质（周铉等，1987）。天麻的花序为茎生总状花序，小花着生于 U 型的苞片内；抽苔开花后，营繁茎逐渐腐化并与母体脱离，而次生球茎的中柱也渐渐空化。

昆明植物所胡忠研究员最先从红天麻次生球茎分离到一种分子量约 14 kD 的蛋白质取名 Gastrodia antifungal protein（GAFP），后来称作 Gastrodianin，它在体外能抑制蜜环菌和绿色木霉（*Trichoderma viride*）的生长（胡忠等，1988），加之天麻次生球茎极少被蜜环菌侵染，因此认为 Gastrodinin 的积累可能在天麻抵御蜜环菌深入球茎内部的机制中起重要作用（胡忠等，1988；Xu 等，1998；Wang 等，2001）。最近发现红天麻 *gastrodianin*-2（*ga*2）的启动子是真菌诱导型启动子，进一步说明天麻 Gastrodianin 基因的表达可能与蜜环菌入侵有关（Sa 等，2003）。

天麻有 4 个亚种，分别是红天麻（*G. elata* Bl. *f. elata*）、黄天麻（*G. elata* Bl. *f. flavida* S. chow）、乌天麻（*G. elata* Bl. *f. glauca* S. chow）和绿天麻（*G. elata* Bl. *f. viridis* Makino），除野生绿天麻资源已变得很稀少以外，其余 3 种都能够栽培繁殖。目前，已先后从红天麻和黄天麻中克隆到一组 Gastrodianin 基因的 cDNA（胡忠等，1999；Sa 等，2003；Wang 等，2001），这些 cDNA 有很高的序列相似性，都具有 516-bp 的开放阅读框。由 Gastrodianin 基因 cDNA 推导的蛋白质属于甘露糖结合蛋白（mannose-binding proteins，MBPs）超家族，迄今为止已在被子植物石蒜科、天南星科、百合科、兰科以及鸢尾科中发现该家族成员（Van Damme 等，1998；2000；Wang 等，2001）。本研究从乌天麻分离到两个新的 Gastrodianin 基因，并首次用 Northern 杂交研究了该基因在植物不同部位的转录表达，研究结果将有助于阐明 Gastrodianin 在天麻这种异养植物的生长发育进程中的生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

乌天麻采自云南昭通，洗净后去除营繁茎的蜜环菌菌索，分别切取营繁茎和次生球茎的表皮层、中柱、花序芽以及花葶和成熟花序，经液氮速冻后在 -70℃保存。蜜环菌菌种由昆明植物所纪大干老师馈赠。

1.2 Gastrodianin 基因的克隆和鉴定

1.2.1 克隆 Gastrodianin 基因　参照异硫氰酸胍法（Chomczynski and Sacchi，1987）提取总 RNA，并根据天麻球茎淀粉含量高的特点进行相应调整，主要是将前两次的离心力加大到 50 000 g，可成功得到高质量的 RNA。

从乌天麻多个次生球茎的混合皮层组织提取总 RNA，用 Superscript™ First-Strand Synthesis kit（Invitrogen）进行反转录合成 cDNA 第一链。基于相似性的克隆策略，根据已知的黄天麻 Ga-NF 基因（GenBank AJ277783）成熟肽设计引物对：5′> *TGGCCATGGCG*TCAGACCGTTTGAATTCC <3 和 5′> *GTGGGATCCCTA*GCCAGACGCCGCCGCT < 3′，酶切位点及其保护序列用斜体字母表示，以上述 cDNA 第一链为模板扩增 Gastrodianin 类似基因片段。PCR 扩增程序：预变性 94℃ 3 min；95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 90 s，循环 35 次，72℃延伸 7 min。目的片段经过割胶纯化、连接转化到大肠杆菌 DH5α 中，送交上海基康生物技术公司测序。以黄天麻 Ga-NF 基因（GenBank AJ277783）的 5′端非翻译区为引物（5′-CCACCTAGCCATCAAGCAGCC-3′），配合 3′adaptor 特异引物（5′> GACCACGCGTATCGATGTCGAC <3′）通过 3′RACE 法得到含有完整读码框的 cDNA 序列，用序列比对软件 CLUSTAL W（1.82 version，http://www.ebi.ac.uk/clustalw/）进行序列分析。

1.2.2 天麻个体不同器官的 RT-PCR 克隆测序　取三个尚未开花（但已有花序芽）的乌天麻和两个抽苔开花的乌天麻作为供试材料，这些材料涵盖天麻生长发育的不同阶段，分别提取未开花天麻的营繁茎、连接区、次生球茎、花序芽和正在抽苔开花的花序、花葶、球茎的总 RNA，用 1.2.1 中的反转录试剂盒得到 cDNA 第一链后进行 PCR，引物对处于非翻译区：5′-CCACCTAGCCATCAAGCAGCC-3′；5′-TGTTGAGGTGTTGGGATGTTC-3′。每个 RT-PCR 至少随机挑取五个克隆进行双向测序。

1.2.3 肽质量指纹谱分析　参照胡忠等（1988）的方法从乌天麻多个次生球茎的皮层组织提取纯化蛋白 Gastrodianin，SDS-PAGE 检测纯度为一条带，蛋白样品交由上海基康生物技术公司用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（Voyager-DE PRO，Applied Biosystems）进行肽质量指纹谱（PMF）分析，所用蛋白酶是胰蛋白酶（Trypsin）。

理论肽谱由 PeptideMass program (http://us.expasy.org/tools/) 生成。

1.3　Northern 杂交分析

将 Ga4B 的 Ser[29]-Gly[157] 肽段对应的基因序列克隆到 pST19 载体的多克隆位点 *Eco*RⅠ/*Hind*Ⅲ，用 SP6 RNA 聚合酶生成地高辛标记的 RNA 反义探针。

分别提取未开花乌天麻的营繁茎皮层 (Nc)、营繁茎中柱 (Cs_n)、次生球茎皮层 (Sc)、次生球茎中柱 (Cs_s) 的总 RNA 和正在抽苔开花的乌天麻小花 (Fl)、花葶 (Is)、次生球茎皮层 (Sc) 的总 RNA，提取离体培养的蜜环菌总 RNA 作为对照，进行甲醛变性电泳，每个样品的 RNA 上样量为 15 μg。用 DIG 标记的 RNA 反义探针在 68℃进行严谨杂交 8 h，杂交液为 Roche 公司的 DIG Easy Hyb buffer，洗膜和免疫检测按试剂盒说明书进行。

2　结果与分析

2.1　基因克隆和序列比对

用已知 Gastrodianin 基因的序列设计引物，通过 RT-PCR 产生了 400 bp 的目的片段，测序得到两种与已知 Gastrodianin 基因相似但不完全相同的 cDNA 序列 (A 型和 B 型)，预示可能是新的 Gastrodianin 基因。为了得到全长 cDNA 序列，以黄天麻的 Ga-NF 基因的 5′端非翻译区为引物通过 3′RACE 法获得含有完整读码框的两个 cDNA 序列，分别命名为 *gastrodianin-4A* (*ga4A*) 和 *gastrodianin-4B* (*ga4B*)，在 GenBank/EMBL database 的序列登记号分别为 AY764387 (*ga4A*) 和 AY764388 (*ga4B*)。

同已知的 Gastrodianin 蛋白序列相似，推导的 Ga4A 和 Ga4B 蛋白质全长序列也在 N 端含有 28 个氨基酸的信号肽，除去信号肽和 C 末端肽以后形成 112 个氨基酸的成熟蛋白，即第 29 位丝氨酸 (S) 到第 140 位天冬酰胺 (N) 的氨基酸序列。将天麻的几种成熟蛋白包括红天麻的 Ga1 和 Ga2 (AF334813)、黄天麻的 Ga-NF 和 Ga-GM (AJ277784) 与兰科植物二叶兰 (*Listera ovata*)、火烧兰 (*Epipactis helleborine*) 以及雪花莲 (*Galanthus nivalis*) 的甘露糖结合蛋白，用序列比对软件 CLUSTAL W 进行序列比对，发现 Ga4A 和 Ga4B 成熟蛋白之间的氨基酸序列一致率为 93%，与其它 Gastrodianins 的氨基酸序列一致率大约为 86% (图 1)。甘露糖结合位点 QXDXNXVXY (图 1 下划线) 位于蛋白的 26 - 34，57 - 65 和 88 - 96 位氨基酸残基；Ga4A 或 Ga4B 有 83 - 86% 的氨基酸与二叶兰 LoMBP (L18895) 和火烧兰 EhMBP

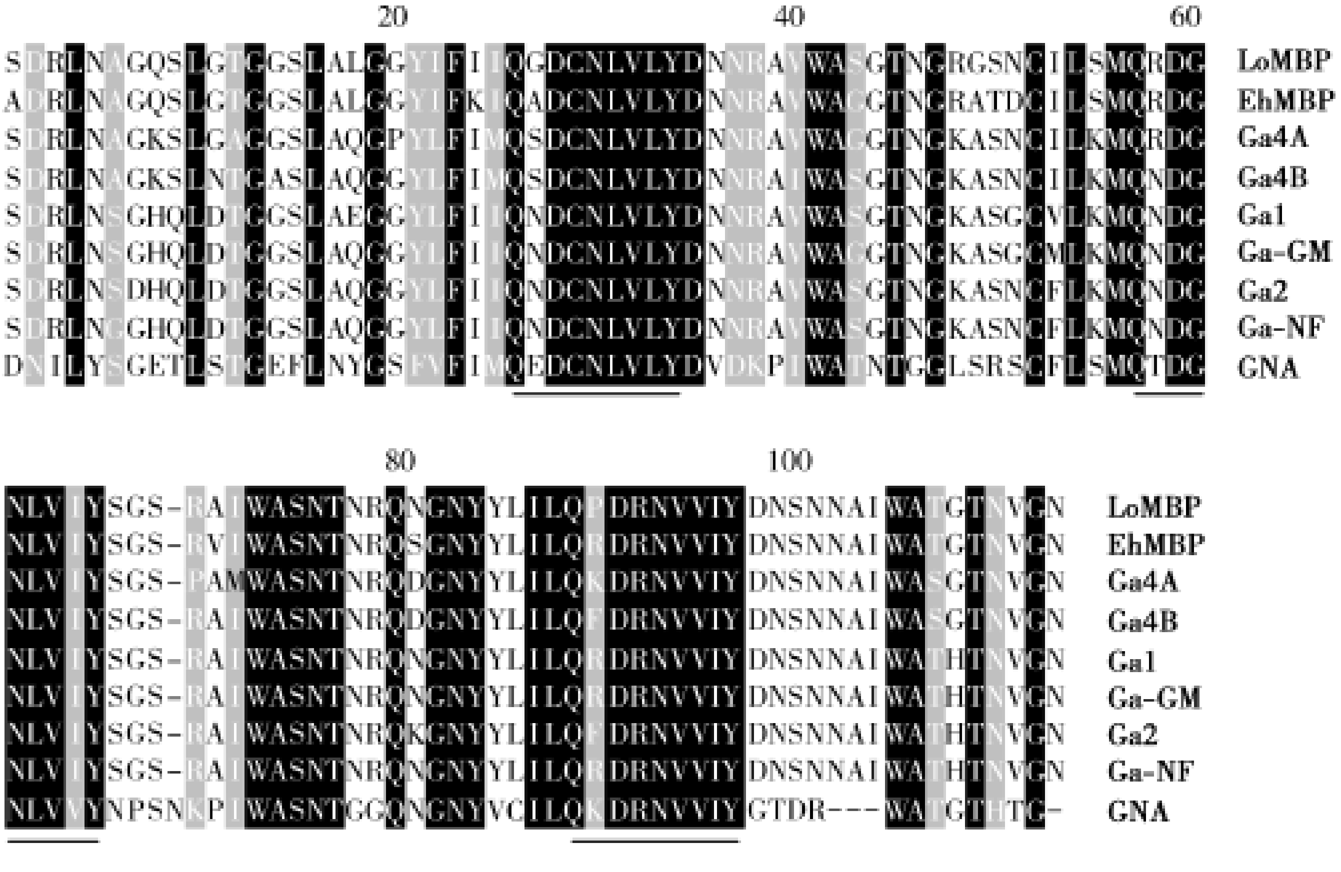

图 1　Gastrodianins 和其它甘露糖结合蛋白的序列比对

相同和相似的氨基酸分别用黑色和灰色阴影显示，三个甘露糖结合部位 QXDXNXVXY 用下划线标示，原始比对图谱用 CLUSTAL W (1.82 version，http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) 软件生成。

Fig. 1　Sequence alignment among gastrodianins and related lectins at the mature protein level.

Identical or similar residues are indicated by dark and light shading, respectively. Three mannose-binding sites (QXDXNXVXY, underlined) exist in all sequences. Alignment was generated by CLUSTAL W (1.82 version, http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

(AAC48927) 相同，而几种 Gastrodianins 与雪花莲凝集素 GNA (1MSAA) 的氨基酸序列一致率在 50% - 53%。

2.2 天麻个体的不同器官只表达同一种 Gastrodianin 基因

在天麻的不同发育阶段，以未开花天麻的营繁茎、连接区、次生球茎、花序芽和正在抽苔开花的花序、花葶、球茎为材料，通过 RT-PCR 和克隆测序发现，来源于同一个体无论是营繁茎还是花序芽的 Gastrodianin 基因克隆都是同一序列，只是有的个体表达 *ga*4*A* 而有的表达 *ga*4*B*。因此，尽管发现乌天麻有两种 Gastrodianin 基因转录表达，但同一个体的不同器官都只表达同一个基因。

2.3 乌天麻 Gastrodianin 的生化鉴定

离体抗菌活性实验证实，从混合的乌天麻球茎皮层分离纯化到的 Gastrodianin 蛋白具有抑制绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 生长的活性，抑制水平与红天麻的相当。由于乌天麻的两种 Gastrodianin 蛋白具有极为相似的理论等电点和分子量(pI/Mr)，分别为 9.06/12211 Da (Ga4A) 和 9.03/12240 Da (Ga4B)，从混合球茎皮层分离纯化到的单一蛋白条带含有 Ga4A 和 Ga4B 两种蛋白，肽质量指纹谱分析也证明这一事实 (图 2)。乌天麻 Gastrodianin 的 PMF 显示，分子量为 1382.4 Da 和 1180.4 Da 的两个主要离子峰与 Ga4A 和 Ga4B 的理论肽谱在分子量和氨基酸序列上都符合；同样，PMF 实际图谱中分子量为 1050.4 Da 和 1032.4 Da 的离子峰分别与 Ga4A 的 A<u>M</u>WASNTNR 肽段和 Ga4B 的 A<u>I</u>WASNTNR 肽段相对应。另一方面，乌天麻的实际和理论 PMF 图谱都没有分子量为 1553.7 Da 的离子峰，该离子对应的序列为 MQ<u>N</u>^{58} DGNLVIYSGSR，却在红天麻和黄天麻 Gastrodianins 的理论图谱中存在；而 1180.7 Da 离子峰 (对应 DGNLVIYSGSR 肽段) 在 Ga4A 和 Ga4B 的实际 PMF 图谱中明显检测到，但其它 Gastrodianins 的理论图谱均不含分子量为 1180.7 Da 的肽段离子。PMF 分析结果证实乌天麻 Gastrodianins 的第 58 位氨基酸应是能被胰蛋白酶识别并水解的精氨酸 (R)，而不是红天麻和黄天麻 Gastrodianins 的天冬酰胺 (N)。

2.4 Gastrodianin 基因在天麻不同器官的转录表达

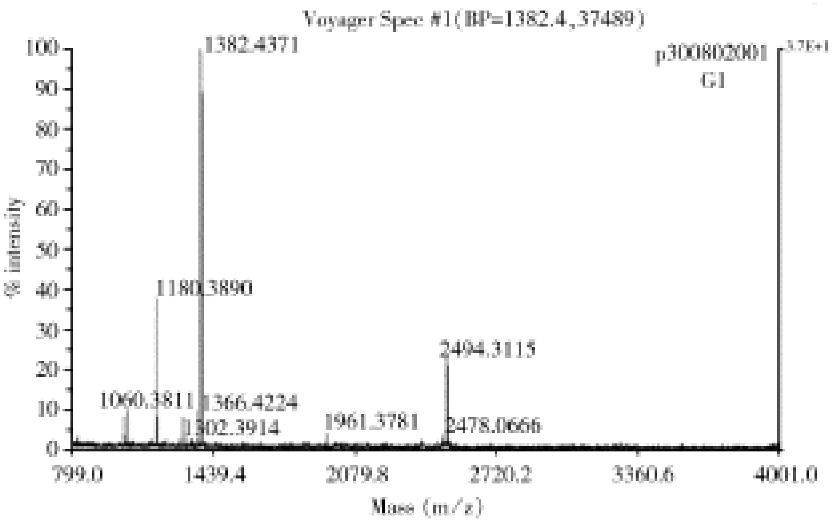

图 2 乌天麻 Gastrodianin 的肽质量指纹谱

Fig. 2 Peptide mass fingerprinting profile of the plant-purified gastrodianin

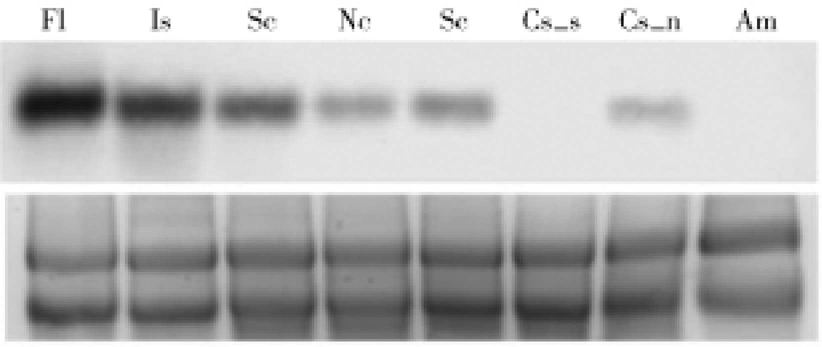

图 3 Gastrodianin 基因在天麻不同器官的转录表达

上图：Northern 杂交的总 RNA 来自小花 (Fl)、花葶 (Is)、次生球茎皮层 (Sc)、营繁茎皮层 (Nc)、次生球茎中柱 (Cs_s)、营繁茎中柱 (Cs_n)、蜜环菌菌丝 (Am)；Nc 和 Cs_s 之间 Sc 是正在开花的次生茎皮层。下图：等量的总 RNA 上样

Fig. 3 Northern blot analysis (above) of gastrodianin transcripts from fully-opened flowers (Fl), inflorescence stalks (Is), the out layer tissues of secondary corms (Sc), the out layer tissues of nutritive corms (Nc), central stele from secondary corms (Cs_s), central stele from nutritive corms (Cs_n), Armillaria mellea hyphae (Am); The Sc between Nc and Cs_s was generated from plants in flowering. 15 μg total RNA per lane was loaded. Ethidium bromide staining of ribosomal RNA showed the equivalence of total RNA loading between the samples (below).

由于 *ga*4*A* 和 *ga*4*B* 的 cDNA 序列一致性达到 98%，而且它们的非翻译区序列也几乎一致，因此，用 *ga*4*A* 或 *ga*4*B* 作为探针很可能得到完全相同的核酸杂交结果。从 *ga*4*B* 生成的 RNA 反义探针用于 Northern 杂交显示，天麻的地上成熟器官 (包括花葶和成熟小花) 的 Gastrodianin 基因转录表达量远远高于地下球茎包括营繁茎和次生球茎，而次生球茎皮层组织的表达量比中柱和整个营繁茎的都高一些；此外，蜜环菌 RNA 中没有检测到 Gastrodianin 基因或类似基因的转录表达 (图 3)。天麻球茎 Gastrodianin 的外周表达模

式可能是天麻在地下抵御蜜环菌入侵球茎皮层内部的防卫机制之一，但它在天麻地上部分的转录表达量明显高于地下的球茎，该结果还是首次报道，暗示 Gastrodianin 的生理作用似乎并不仅限于此。

3　讨论

迄今已从天麻的 3 个亚种发现 10 余个 Gastrodianin 基因，其中黄天麻的两个基因编码的成熟蛋白之间仅相差两个氨基酸（Wang 等，2001），与黄天麻的 Ga-NF 相比，来自红天麻的 Ga1 和 Ga2 有四个不同氨基酸，而本研究发现的乌天麻 Gastrodianins 的氨基酸序列变异最大，各有十五个不同氨基酸，变异高发位点在第 6～12 残基（图 1）。尽管在天麻同一亚种已发现两个或两个以上的 Gastrodianin 基因，但同一个天麻植株无论是地下的球茎还是地上的花器官，都只表达同一种基因。

本研究发现并证实了 Gastrodianin 基因在天麻地上器官的表达丰度明显高于地下器官（图 3)。先前推测 Gastrodianin 可能在营繁茎合成然后被运往次生球茎积累于次生球茎的皮层组织中，至抽苔时转移到花葶中（胡忠等，1994)。但本研究的实验证据表明，次生球茎皮层和花葶花序都能够转录表达 Gastrodianin 基因，而且其转录水平明显高于营繁茎。也就是说，Gastrodianin 在天麻次生球茎皮层和花葶花序中能够大量合成，应该没有必要从营繁茎转运而来。天麻球茎 Gastrodianin 的外周表达模式可能是天麻在地下抵御蜜环菌入侵球茎皮层内部的防卫机制之一，但它在天麻地上部分的转录表达量明显高于地下的球茎，该结果还是首次报道，暗示 Gastrodianin 的作用似乎并不仅限于此。这一发现在某种程度上有些“意外”，似乎与 Gastrodianin 抵御蜜环菌的功能不太相配，因为天麻的地上成熟器官约有 1 m 高，几乎不可能接触到营腐生生活的蜜环菌，故推测 Gastrodianin 可能蕴藏其它生理功能，比如抵御昆虫或其它病菌。但另一方面，已报道的兰科其它植物的 MBPs 大都来自地上部分的叶片或果实（Van Damme 等，1998)，因此 Gastrodianin 表达量在天麻花器官最高也应是预料之中。

其实，我们对单子叶植物甘露糖结合蛋白(或称凝集素）包括 Gastrodianin 的生物学功能还知之甚少。据 Peumans and Van Damme（1995）以及 Barre 等（1996）报道，MBPs 在植物抵御有害动物、昆虫以及微生物侵害时起到某种防卫作用，如此推测，Gastrodianin 同雪花莲凝集素 GNA 或其他凝集素相似，有可能参与天麻对微生物或昆虫的防卫机制。已有的研究表明，除极个别凝集素如火烧兰单体凝集素（*Epipactis helleborine* merolectin）外，大多数 MBPs 并无抗真菌活性(Wang 等，2001)。虽然 Gastrodianin 显示体外抗真菌活性，但它同已知的几类抗真菌蛋白在序列和结构上并无任何同源性，后者为几丁质结合蛋白如 hevein or hevein-like proteins，因此很难相信 Gastrodianin 也以几丁质结合的方式起作用。北京生物物理研究所的王大成研究组在解析 Gastrodianin 的晶体结构时发现，典型的 MBP 只同甘露糖结合（Liu 等，2005)；而 Gastrodianin 独特的四级结构— 新型单体，使其有别于其它 MBP 超家族成员。因此，认为单体的整体结构而非局部的结构变化造就了 Gastrodianin 的抗真菌活性（Liu 等，2005)，Gastrodianin 的单体结构状态是其抗真菌活性的支撑因素，事实上火烧兰单体凝集素也具有体外抗真菌活性，但二聚体和四聚体凝集素如雪花莲凝集素 GNA 却没有（Wang 等，2001)。尽管如此，Gastrodianin 在植物体内的作用仍然是个谜，但结合天麻离体培养、细胞壁结构解析以及基因调控技术的运用，谜团会逐渐解开。

〔参　考　文　献〕

Barre A, Van Damme EJM, Peumans WJ *et al*. 1996. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins [J]. *Plant Physiol*, **112**: 1531—1540

Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, **162**: 156—159

Hu Z (胡忠), Yang Z (杨增明), Wang J (王钧), 1988. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata* corm [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **10**: 373—380

Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻), 1994. Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **16**: 169—177

Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻), Liu XZ (刘小烛) *et al*. 1999. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-1 from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **21**: 131—138

Liu W, Yang N, Ding J *et al*. 2005. Structural mechanism governing the quaternary organization of monocot mannose-binding lectin revealed by the novel monomeric structure of an orchid lectin [J]. *J Biol Chem*, **280**: 14865—14876

Peumans WJ, Van Damme EJM, 1995. Lectins as plant defense proteins [J]. *Plant Physiol*, **109**: 347—352

Sa Q, Wang Y, Li W *et al*. 2003. The promoter of an antifungal protein gene from *Gastrodia elata* confers tissue-specific and fungus-inducible expression patterns and responds to both salicylic acid and jasmonic acid [J]. *Plant Cell Rep*, **22**: 79—84

Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A *et al*. 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles [J]. *Crit Rev Plant Sci*, **17**: 575—692

Van Damme EJM, Astoul CH, Barre A *et al*. 2000. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae) [J]. *Eur J Biochem*, **267**: 5067—5077

Wang X, Bauw G, Van Damme EJM *et al*. 2001. Gastrodianin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with anti-fungal properties [J]. *Plant J*, **25**: 651—661

Xu Q, Liu Y, Wang X *et al*, 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata* [J]. *Plant Physiol Biochem*, **36**: 899—905

Zhou X (周铉), Yang XH (杨兴华), Liang HX (梁汉兴) *et al*. 1987. Morphology of Tian-Ma (Gastrodia) (天麻形态学) [M]. Beijing: Science Press